



AGRO-BIO

La Réponse
Protéomique &
Immunologique

2 allée de la Chavannerie
45240 La Ferté Saint Aubin
France
Tél. 33 (0)2 38 64 83 50
Fax. 33 (0)2 38 64 83 59
www.agro-bio.fr

17

Temps de coagulation de la poudre acétonique de cervelles de lapins

Version 2010/01

FR

1 - PRESENTATION

L'exemple ci-dessous est donné pour une quantité initiale de 1,5 gramme de Poudre Acétonique de Cervelles de Lapins.

Les échantillons de poudre congelée doivent être sortis à température ambiante au moins 30 minutes avant leur utilisation.

Note : Ne pas réhydrater la poudre.

- Préchauffer 10 mL de sérum physiologique à 37°C pendant 20 minutes minimum au bain-marie dans des tubes de 15 mL identifiés.
- Ajouter 1,5 g de poudre de cervelles à tester, à intervalle régulier (en général, toutes les trente secondes) : vider le tube de la poudre à contrôler dans le tube de 15 mL correspondant.
- Déclencher le chronomètre au premier tube.
- Agiter vigoureusement le mélange poudre + sérum physiologique.
- Laisser incuber 23 minutes à 37°C en agitant par retournement toutes les 3 minutes.
- Retirer du bain-marie en respectant l'intervalle de temps de mise en incubation (en général toutes les trente secondes).
- Centrifuger 15 minutes à 2465 g (3000 rpm pour un rotor de rayon : 24,5 cm) à température ambiante.
- Récupérer un volume nécessaire de thromboplastine.
- Collecter 0,5 mL de surnageant (thromboplastine) dans le milieu de la phase supérieure (prendre garde à ne pas mélanger le culot avec les particules).

Le rendement d'extraction varie en fonction des conditions d'extraction, telles que :

- La température d'extraction (Ne pas dépasser 42°C afin de prévenir tout dommage des extraits de thromboplastine. La température optimale d'extraction est entre 37 et 42°C),
- La force ionique de l'extraction (une force ionique optimale doit être déterminée pour optimiser le rendement d'extraction),
- Ajout de produits chimiques spécifiques (par exemple : l'ajout de 7,5 mmol/L de Formiate de calcium au cours de l'étape d'extraction peut contribuer à rendre la thromboplastine plus sensible au facteur VII).

2 - DETERMINATION DU TEMPS DE COAGULATION DE LA POUDRE ACETONIQUE DE CERVELLES DE LAPINS

- Effectuer le mélange suivant dans un tube à hémolyse identifié :
 - Thromboplastine 0,5 mL
 - CaCl₂ (0,025 M) 1,6 mL
 - H₂O MilliQ 1,9 mL
- Déterminer le temps de coagulation sur du plasma frais citraté ou lyophilisé selon la procédure habituelle (*1 volume de plasma pour 2 volumes de thromboplastine*).
- Plasma
 - Le temps de coagulation de la poudre est contrôlé avec du plasma non dilué ou dilué au quart.
 - Sortir le plasma (de 2-8°C ou de -20°C) au moins trente minutes avant utilisation.
 - Reconstituer par 1 mL d'H₂O purifiée.
 - Laisser se stabiliser 30 minutes à température ambiante (18-25°C). Puis pour le contrôle, diluer au ¼ en tampon Owren-Koller.
 - Ainsi reconstitué, ce réactif est stable 4 heures à 20°C (ne pas congeler).
- Thromboplastine
 - La Thromboplastine doit être incubée 20 minutes à 37°C avant les tests.
- Néoplastine
 - Sortir le flacon contenant la galette (de 2-8°C ou de -20°C) et le solvant (de 2-8°C) au moins 30 minutes avant leur utilisation.
 - Reconstituer en transvasant le solvant dans le flacon lyophilisé.
 - Laisser la solution se stabiliser 30 minutes à température ambiante (18-25°C).
 - Agiter doucement pour obtenir une suspension homogène.
 - Incuber le flacon 20 minutes au bain-marie à 37°C avant les tests sur le ST4 ou le STart.
 - Ainsi reconstitué ce réactif est stable 8 heures à 37°C, 24 heures à 20°C, 8 jours à 2-8°C (ne pas congeler).
- Tests (deux références internes sont utilisées pour le contrôle positif) :
 - Distribuer les billes dans les cupules des cuvettes.
 - Au préalable, mettre en service le ST4 ou le STart afin qu'il se stabilise à 37°C.
 - Une fois la température de l'appareil stabilisée à 37°C, charger la pipette eppendorf avec l'échantillon à tester.
 - Régler le volume de la pipette à 100 µL : cran 2 pour le combitip de 2,5 mL ou cran 4 pour le combitip 1,25 mL.
 - Déposer, avec une pipette de volume approprié, 50 µL de plasma pur (100 %) ou dilué au ¼ (25 %) dans les cuvettes avec billes.
 - Mettre la barrette en position d'incubation pendant 120 secondes exactement.
 - 10 secondes avant la fin :
 - Transférer la barrette en position de mesure.
 - Purger la multi-pipette dans le tube d'échantillon à tester et homogénéiser.
 - Distribuer 100 µL d'échantillon pré-incubé dans chaque cupule.
 - Imprimer le temps de coagulation.

Agro-Bio est agréé par la préfecture de Loir-et-Cher pour la manipulation et l'entreposage de matières de catégorie 3.
N° d'agrément : 41.285.01

